

Über die Herkunft der Benzoesäure bei Mensch und Tier

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
JEAN PAUL VUILLEUMIER
aus Basel

VERLAG P. G. KELLER – WINTERTHUR 1956

Über die Herkunft der Benzoesäure bei Mensch und Tier

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von
JEAN PAUL VUILLEUMIER
aus Basel

VERLAG P. G. KELLER – WINTERTHUR 1956

Genehmigt von der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der Herren Professoren K. Bernhard und T. Reichstein.

Basel, den 5. Juli 1955

Der Dekan

L. Vonderschmitt



A mes chers parents

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Karl Bernhard, auf dessen Veranlassung diese Arbeit ausgeführt wurde, an dieser Stelle für seine Unterstützung und die wertvollen Ratschläge herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	7
II. Entstehung von Benzoesäure aus Phenylalanin oder Tyrosin	9
A. Über den Abbau von Phenylalanin und Tyrosin im Tierkörper	9
B. Verabreichung von Deuterio-Phenylalanin an Kaninchen, Meerschweinchen und Mensch	11
C. Diskussion der Ergebnisse	14
III. Untersuchungen über die Benzoesäurebildung durch Aromatisierung hydroaromatischer Verbindungen	15
A. Isolierung deuteriohaltiger Benzoesäure nach Anreicherung der Körperflüssigkeit der Versuchstiere an D ₂ O	15
B. Fütterung von Heuextrakten	16
C. Benzoesäure aus Chinasäure	17
D. Diskussion der Ergebnisse	19
IV. Benzoesäure aus Geraniol oder Beeinflussung der Benzoesäurebildung durch diese Substanz	21
V. Benzoesäurebildung aus Vanillin	23
VI. Mögliche Benzoesäureentstehung aus kleinen Bruchstücken des Stoffwechsels	24
VII. Stoffwechsel von Carboxyl- ¹⁴ C-Benzoesäure	25

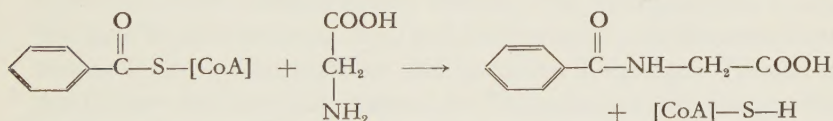
Experimenteller Teil

A. Allgemeines	27
Durchführung der Stoffwechselversuche	27
Harnaufarbeitung auf Benzoesäure	28
Versuche mit Benzoesäure- ¹⁴ C	29
Gewinnung von deuteriertem Phenylalanin	30
Gewinnung von Benzolcarbonsäure- ¹⁴ C	31
B. Versuche mit Deuterio-Phenylalanin	32
Verabreichung an Kaninchen	32
Verabreichung an Meerschweinchen	34
Versuche am Menschen	34
C. Benzoesäurebildung durch Aromatisierung	35
1. Benzoesäureausscheidung von Meerschweinchen nach vorangehender Anreicherung des Körperwassers an D ₂ O	35
2. Orale Application von Hexahydrobenzoesäure an Ratte nach Anreicherung der Körperflüssigkeit an D ₂ O	36
3. Fütterung von Heuextrakten an Meerschweinchen	36
4. Versuche mit Chinasäure	37
D. Geraniol	41
E. Vanillin	42
F. Versuche mit Acetat-1- ¹⁴ C	42
G. Gaben signierter Benzoesäure	44
Zusammenfassung	48
Literaturverzeichnis	50

I. EINLEITUNG

Hippursäure ist ein normaler Bestandteil des Harnes von Menschen und vielen Tieren. Bei gemischter Nahrung scheidet der Erwachsene etwa 0,8 g davon täglich aus. Die Verbindung erregte vielfach Interesse, einmal bezüglich der Herkunft ihrer Komponenten, d. h. vor allem der Benzoesäure, andererseits aber auch hinsichtlich ihrer Entstehung aus Benzoesäure und Glykokoll. *Bunge* u. *Schmiedeberg* (1) nahmen im Jahre 1876 bei Hunden Nierendurchblutungen vor unter Zugabe von Benzoesäure und Glykokoll zur Durchströmungsflüssigkeit und konnten sowohl im durchgeleiteten Blute als auch im aus dem Ureter abfließenden Harn Hippursäure nachweisen.

Über die Entstehung der Hippursäure liegen in neuester Zeit Untersuchungen von *Borsook* vor (2). *Chantrenne* (3) zeigte ganz kürzlich, dass diese Synthese vom Coenzym A abhängig ist. Benzoyl-Coenzym A reagiert mit der Aminogruppe des Glykokolls unter Bildung von Hippursäure:



Während also die Hippursäuresynthese wohl nicht zuletzt deshalb weil sie als Modell einer Peptidbildung aufgefasst werden kann, in ihren Einzelheiten weitgehend bekannt ist, bestehen für die Herkunft der Benzoesäure immer noch keine sicher bewiesenen Vorstellungen. Zwei Annahmen standen stets im Vordergrund, einmal die Voraussetzung, die pflanzliche Nahrung enthalte bereits Benzoesäure und andererseits die Vermutung, ringförmige Aminosäuren aus dem Eiweiss kämen als Muttersubstanzen in Betracht.

Die vorliegenden Versuche wurden in der Absicht unternommen, zur Aufklärung der Herkunft der Benzoesäure im menschlichen und tierischen Harne beizutragen, wobei durch die Heranziehung der Isotopentechnik gewisse Voraussetzungen gegeben waren, um zur Lösung des einen oder anderen Teilproblems zu gelangen.

II. ENTSTEHUNG VON BENZOESÄURE AUS PHENYLALANIN ODER TYROSIN

A. Über den Abbau von Phenylalanin und Tyrosin im Tierkörper

Die Herkunft der Benzoesäure aus Phenylalanin, Tyrosin oder sogar Tryptophan wurde verschiedentlich erwogen und liegt, jedenfalls theoretisch betrachtet, im Bereiche des Möglichen. Phenylpropionsäure gibt an Hunde verfüttert Benzoe- bzw. Hippursäure. Beim Menschen führt Phenylalaninaufnahme aber offensichtlich nicht zu vermehrter Hippursäurebildung, während Schafe etwa die Hälfte des Phenylalaninstickstoffes als Hippursäure eliminieren sollen (4). Es darf angenommen werden, dass die in der Hippursäure in Erscheinung tretende Benzoesäure im Wesentlichen das Desaminierungsprodukt des Phenylalanins ist (5).

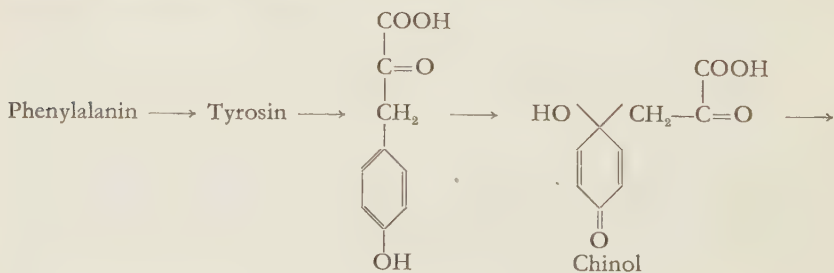
1934 zeigten *Womack* und *Rose* (6,) dass Phenylalanin zu den essentiellen Aminosäuren gehört. In der Nahrung kann es Tyrosin ersetzen, nicht aber durch Tyrosin ersetzt werden. Den Übergang von Phenylalanin zu Tyrosin bewiesen *Moss* und *Schönheimer* (7). Sie fütterten Ratten ringdeuteriertes Phenylalanin und isolierten D-haltiges Tyrosin aus den Organ- und Gewebsproteinen der Versuchstiere. Die festgestellten D-Werte liessen erkennen, dass mindestens 20–30 % des angebotenen Phenylalanins in Tyrosin umgewandelt wurden. Der Vorgang verläuft nicht umgekehrt.

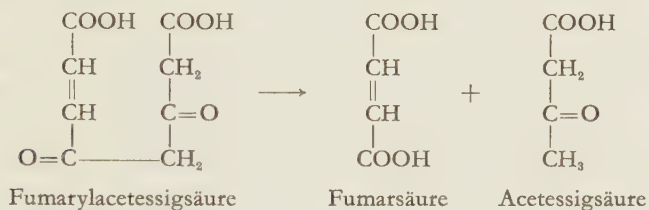
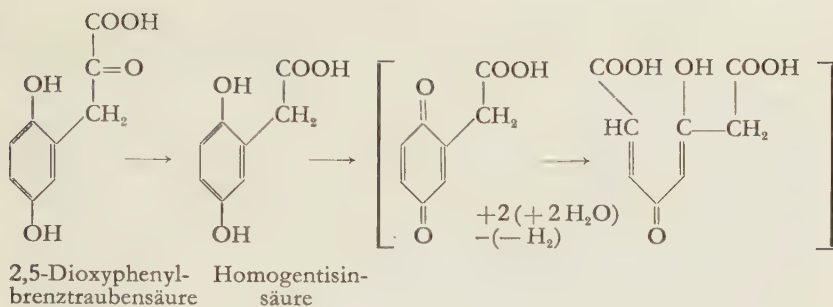
1922 fanden *Kotake*, *Masai* und *Mori* (8) nach Gaben von Phenylalanin an Kaninchen Phenylbrenztraubensäure, eine Beobachtung, die von *Shambough*, *Lewis* und *Tourtelotte* (9) bestätigt wurde. In der Folge beschrieben nacheinander *Penrose* (10), *Fölling* (11) und *Jervis* (12) eine Störung des Phenylalaninstoffwechsels beim Menschen, die sog. *Oligophrenia phenylpyruvica*. Es handelt sich dabei um eine seltene Form angeborenen Schwachsinn, bei welcher im Harne Phenylbrenztrauben-

säure angetroffen wird. Die Patienten reagieren nach Gaben von Phenylalanin oder Phenylbrenztraubensäure mit erhöhter Ausscheidung an letzterer. Daneben treten auch Phenylmilchsäure und Phenyl-essigsäure im Harn auf.

Eine weitere Stoffwechselstörung auf dem Gebiete des Phenylalanin-Tyrosinabbaues liegt bei der *Alkaptonurie* vor. Bei solchen Patienten zeigt der Harn eine dunkle Färbung und enthält 2,5-Dioxyphenylessigsäure, die in Analogie zur Gentisinsäure, dem Aglukon aus Gentisin, Homogentisinsäure genannt wurde. Diese Stoffwechselabweichung hat sehr zur Aufklärung des Tyrosinabbaues beigetragen. Die Annahme lag nahe, in der Homogentisinsäure ein normales Abbauprodukt des Tyrosins zu vermuten, das im Falle des Alkaptonurikers nicht weiter abgebaut werden kann und deshalb zur Ausscheidung gelangt.

Der völlige Abbau des Phenylalanins oder Tyrosins wäre demnach mit der oxydativen Öffnung des Ringes verbunden. Bereits *Jaffé* (13) hatte nach Fütterung von Benzol aus Hundeharn geringe Mengen Muconsäure isoliert. Nach intraperitonealer Injektion von Deuterio-Benzol an Kaninchen erhielten *Bernhard* und *Gressly* (14) D-haltige Muconsäure, womit die Aufspaltung des Benzolringes bewiesen war. Bei der Durchströmung der Leber mit Tyrosin oder Homogentisinsäure hatte *Emden* Acetessigsäure aufgefunden. Den sicheren Nachweis der Ringaufspaltung der Homogentisinsäure zu Acetessigsäure erbrachten wiederum Isotopenversuche u. a. von *Weinhouse* und *Millington* (15) unter Verwendung von Tyrosin- β - C^{14} und *Shepartz* und *Gurin* (16) ausgehend von C^{14} -signiertem Phenylalanin. Ihre Resultate wurden durch Arbeiten von *Winnick*, *Friedberg* und *Greenberg* (17) gestützt. Neuerdings wurden weitere Spaltstücke, nämlich Fumarsäure und Äpfelsäure nachgewiesen. Der Abbau des Phenylalanins über Homogentisinsäure kann auf Grund solcher Befunde daher folgendermassen formuliert werden:





Mit diesen Erkenntnissen ist eine Relation zwischen Phenylalanin und Harn-Benzoesäure nur schwer vereinbar.

Neben dem geschilderten Abbauweg, dem in quantitativer Hinsicht wohl der Vorrang gebührt, sind aber natürlich andere Möglichkeiten nicht ausgeschlossen. *Salkowski* (18) und auch *Baumann* (19) nahmen an, Phenylalanin werde im Darm bakteriell zu Phenylpropionsäure abgebaut, welche zur Resorption gelange und in Benzoesäure übergehe. Schliesslich wäre auch ein Abbau in der Zelle auf die Stufe eines Benzoesäurebildners denkbar, wobei die weitere Oxydation nicht über Homogentisinsäure, sondern unter Verzicht auf die Ringoxydation verlief. p-Oxyphenylmilchsäure führt ja beim Alkaptonuriker nicht zu einer Vermehrung der Homogentisinsäure.

B. Verabreichung von Deuterio-Phenylalanin an Kaninchen, Meerschweinchen und Mensch

Ein Übergang von Phenylalanin in Benzoesäure müsste sich unter Verwendung einer im Ring signierten Aminosäure beweisen lassen. Für eine solche Markierung käme in erster Linie der radioaktive Kohlenstoff ^{14}C in Betracht. Wir mussten indessen aus äusseren

Gründen, vor allem infolge der Kostspieligkeit dieses Verfahrens darauf verzichten. Zudem war der Umstand zu berücksichtigen, dass Versuche an Menschen mit einem radioaktiven Isotopen der Halbwertszeit von über 5000 Jahren eine Gefährdung bedeuten würden. Bei einer Fixierung der aktiven Kohlensäure im Knochen, dem die Struktur eines Hydroxylapatites zukommt, wäre eine Schädigung auch bei einem sehr schwachen Strahler auf lange Sicht nicht ausgeschlossen.

Wir wählten daher zur Signierung den schweren Wasserstoff, der sich bekanntlich zur erfolgreichen Bearbeitung zahlreicher Probleme bestens bewährte und stellten nach den Angaben von *Schönheimer* und *Moss* (20) Deuterio-Phenylalanin her. Über die Stabilität bzw. die Labilität der Wasserstoffatome im Phenylalanin bzw. Tyrosin bestehen eingehende Untersuchungen von *Rittenberg* und Mitarb.(21). In unserem Zusammenhange sind indessen diese Überlegungen weniger von Bedeutung. Ein merklicher Austausch von Deuterium gegen Wasserstoff dürfte bei einem Übergang von Phenylalanin durch Seitenkettenabbau zu Benzoesäure nicht eintreten. Letzteres ist indessen der Fall bei stattfindender Hydroxylierung des aromatischen Ringes.

Die signierte Aminosäure haben wir als Racemat, als D- oder L-Form zuerst normal gefütterten Kaninchen verabreicht und aus dem während längerer Zeit gesammelten Harn jeweils die Benzoesäure isoliert und auf ihren Deuteriumgehalt untersucht. Die Resultate dieser Versuche ergeben sich aus der Tabelle 1.

Tabelle 1:

Orale Gaben von DL-, D- und L-Deuterio-Phenylalanin an Kaninchen

Vers. No.	Dauer Tage	Form	Deuterio-Phenylalanin			Benzoe- säure At. % D
			total g	mg kg/die	Atom % D	
1	7	DL	1	71	17,9	0,02
2	6	DL	1	86	17,9	0,08
3	12	D	2,2	50	12,1	0,11
	3					0,06
	4					0,04
4	17	L	2,12	50	12,1	0,11
	3					0,09
	4					0,02

Im Sinne eines eigentlichen Belastungsversuches haben wir einem 2,5 kg schweren Kaninchen an 8 aufeinanderfolgenden Tagen je 1 g Deuterio-DL-Phenylalanin mit der Schlundsonde verabreicht und täglich 500 g Rüben gefüttert. Aus der Harnmenge von 2950 ml ergaben sich 580 mg Benzoesäure, die durch Sublimation gereinigt zur D-Messung gelangten und 2,82 Atom % D aufwiesen (Versuch No. 5).

In analoger Weise haben wir auch an Meerschweinchen Deuterio-DL-Phenylalanin verabreicht. Die diesbezüglichen Resultate enthält die Tabelle 2.

Tabelle 2:

*Fütterung von Deuterio-DL-Phenylalanin
(12,45 Atom % D) an Meerschweinchen*

Vers. No.	Dauer Tage	Deuterio-Phenylalanin total g	mg/kg die	Benzoe- säure At. % D
6	13	1,5	520	0,15
	7			0,03
7	12	0,7	300	0,11
	7			0,03
8	14	1,0	320	0,12
	7			0,04

Deuterio-DL-Phenylalanin wurde schliesslich auch von drei gesunden Versuchspersonen mit normaler Kost aufgenommen (Tabelle 3).

Tabelle 3:

Aufnahme von Deuterio-DL-Phenylalanin durch Versuchspersonen

Vers. No.	Versuchs- person	Dauer Tage	Deuterio-Phenylalanin			Benzoe- säure At. % D
			total g	mg/kg die	Atom % D	
9	V.	6	8	29/14	21,26	0,14
		4				0,05
10	U.G.	3	2	13	16,0	0,05
		2				0,04
11	R.V.	4	2,8	14	16,0	0,09

C. Diskussion der Ergebnisse

Fütterung von Deuterio-Phenylalanin an Kaninchen oder Meerschweinchen bzw. Aufnahme durch drei gesunde Versuchspersonen bei einheitlicher Ernährung führten in allen Fällen zur Ausscheidung von Hippur- bzw. Benzoessäure mit geringen, aber deutlich feststellbaren Gehalten an schwerem Wasserstoff. Es kann sich dabei nicht darum handeln, dass Deuterium über das Körperwasser in die Benzoessäure aufgenommen wurde, da *Rittenberg* und Mitarb. (21) bewiesen, dass im Deuterio-Phenylalanin kein diesbezüglicher Austausch stattfindet. Die angebotenen Mengen an D-signierter Aminosäure mit D-Gehalten von 12–22% wären zudem zu geringfügig, um eine Anreicherung des Körperwassers an D_2O in einem ausreichenden Ausmasse herbeizuführen. Das gilt ganz besonders für die Versuche am Menschen. Es besteht somit kein Zweifel, dass Phenylalanin zur Benzoessäure-Bildung beitragen kann, aber offenbar nur in einem quantitativ geringfügigen Ausmasse. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass die in der Benzoessäure angetroffenen D-Gehalte minimale Werte darstellen, da die verfütterte signierte Aminosäure, insofern es sich um die L-Form handelte, durch merkliche Mengen von körpereigenem Phenylalanin verdünnt werden kann. Es bleibt zu entscheiden, ob es sich dabei vornehmlich um bakterielle Vorgänge im Darme handelt, welche direkt zu Benzoessäure oder zu einem Vorläufer derselben führten. Von einer parenteralen Applikation haben wir abgesehen, da sich die geprüfte Aminosäure infolge ihrer geringen Wasserlöslichkeit nur schlecht dazu eignet. Wir möchten indessen annehmen, dass die Zelle neben dem geschilderten Phenylalanin-Tyrosinabbau durch Ringoxydation noch über weitere Abbaumöglichkeiten verfügt und Benzoessäure auch ohne bakterielle Tätigkeit daraus entstehen kann.

III. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BENZOE- SÄUREBILDUNG DURCH AROMATISIERUNG HYDROAROMATISCHER VERBINDUNGEN

A. Isolierung deuteriumhaltiger Benzoesäure nach Anreicherung der Körperflüssigkeit der Versuchstiere an D_2O

Die mitgeteilten Befunde berechtigen nicht zur Annahme, Phenylalanin trage in einem wesentlichen Ausmasse zur Benzoesäurebildung bei. Man könnte sich vorstellen, der aromatische Ring der Benzolcarbonsäure werde im Organismus aus einer entsprechenden hydroaromatischen Vorstufe gebildet, indem z.B. von verschiedener Seite (27) auf die Chinasäure als Vorstufe der Benzoesäure hingewiesen wurde. *Bernhard* und Mitarb. (28) haben in ausgedehnten Versuchen solche in vivo stattfindende Aromatisierungen bewiesen, die von anderer Seite (29) bestätigt und erweitert wurden. Verabreichung von Deuterio-Hexahydrobenzoesäure führt zu Deuterio-Benzoesäure.

Eine Aromatisierung müsste unter Beteiligung des Körperwassers verlaufen und es wäre zu erwarten, dass nach Anreicherung desselben an D_2O eine D-haltige Benzoesäure zur Ausscheidung gelange. Wir haben bei zwei vorwiegend mit Heu gefütterten Meerschweinchen eine solche Anreicherung vorgenommen und in beiden Fällen D-haltige Benzoesäure erhalten (Tabelle 4). Dieselbe wies sogar höhere D-Werte auf als die Leberlipide.

Eine deuterierte Benzoesäure sollte folglich auch nach Gaben von Hexahydrobenzoesäure an Tiere, deren Körperwasser entsprechend signiert wurde, auftreten, während andererseits Zufütterung von Benzoesäure in solchen Fällen eine Herabsetzung des D-Gehaltes der Harn-Benzolcarbonsäure bewirken müsste.

Wir haben daher einer Ratte neben schwerem Wasser während 30 Tagen täglich 10 mg Benzoesäure zusammen mit einem normalen

Tabelle 4

Vers. No.	Dauer Tage	Atom % D im Körper- wasser	Benzoessäure erhalten mg	Atom % D	Leberlipide mg	Atom % D
12	18	1,98	540	0,66	110	0,41
13	35	1,52	470	0,59	110	0,33

Futter verabreicht und aus dem Harn 300 mg Benzoessäure mit einem Gehalt von 0,21 Atom % D erhalten (Versuch No. 14). Anschliessend erhielt dieses Tier während 5 Tagen insgesamt 750 mg Hexahydrobenzoessäure, was zur Ausscheidung von Benzoessäure mit 0,64 Atom % D führte. Das Körperwasser enthielt 2,68 Atom % D.

B. Fütterung von Heuextrakten

Diese Befunde sprechen sehr deutlich für eine mögliche Benzoesäure-Bildung durch Aromatisierung oder Dehydrierung mit der Nahrung aufgenommener Verbindungen. Besonders beim Meerschweinchen ist die D-Konzentration der Benzoessäure bei Heufütterung bemerkenswert hoch und es scheint, dass bei Pflanzenfressern Benzoessäure- bzw. Hippursäure-Ausscheidung der Menge des aufgenommenen Heues proportional verläuft.

Wir haben wässrige Heu-Auszüge an Meerschweinchen verfüttert und dabei die Benzoessäureausscheidung verfolgt (Versuch No. 15) (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5

Tier	Versuchs- dauer Tage	mg Benzoessäure aus Harn	
		Kontrollperiode	Heuextrakt
A	10	23	356
B	10	10	202

In gleicher Weise wurde auch der nach Extraktion verbleibende Rückstand geprüft (Versuch No. 16) (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6

Tier	Versuchs- dauer Tage	mg Benzoessäure aus Harn	
		Kontrollperiode	Heurückstand
C	8	57	252
D	8	61	161

Die Zunahmen der Benzoessäureausscheidung sind sehr deutlich. Sie betragen im Falle der wässrigen Auszüge das 15- bis 20fache der Kontrollen. Wir haben daraufhin auch noch die Wirkung eines mit verdünnter Salzsäure erhaltenen und mit Äther extrahierten Heu-extraktes geprüft. Vor allem nach Verfütterung des Salzsäure-Extraktes konnten wir eine deutliche Erhöhung der Benzoessäure-ausscheidung nachweisen, während sich der Aether-Auszug etwas weniger wirkungsvoll erwies (Tabelle 7).

Tabelle 7:

Versuch No. 17

Fraktion	Dauer Tage	Benzoessäure- zunahme, mg
Salzsäure-Auszug (C)	14	194
Salzsäure-Auszug (C)	16	126
Aether-Auszug (B)	10	77
Heu-Rückstand (A)	8	127

Wir halten es für sehr wahrscheinlich, dass der mit Wasser extra-hierbare Anteil des Benzoessäureprecursors die Chinasäure selber ist. Über den im unlöslichen Rückstand zurückbleibenden Benzoessäure-bildner können wir nur Vermutungen äussern; so könnte die Fixie-rung der Chinasäure in Depsiden, wie z. B. Chinasäure in der Chloro-genensäure vorliegt, die Wasserlöslichkeit herabsetzen.

C. Benzoessäure aus Chinasäure

Von den Verbindungen, welche durch den tierischen Organismus in Benzoessäure übergeführt werden könnten, sollen uns im Folgenden nur diejenigen interessieren, die durch Dehydrierung dazu führen, also hydroaromatischen Charakter besitzen.

Bernhard (28a,b,c) zeigte, dass Cyclohexancarbonsäure, Hexahydrobenzamid (-N-Methyl und -N-Dimethyl) und Hexahydrohippursäure aromatisiert und als Benzoessäure bzw. Hippursäure eliminiert werden (vgl. auch *Doisy und Mitarb.* (29c)). Auch hydroaromatische Ringe mit längerer Seitenkette können Benzoessäure liefern, so: Cyclohexylpropionsäure (28b), Cyclohexylvaleriansäure und Cyclohexyl- α -aminobuttersäure (28d). *Dickens* (29a,b) zeigte 1947, dass die Aromatisierung der Cyclohexancarbonsäure in der Leber und zu einem geringen Teil in der Niere erfolgt. Interessant ist der Befund von *Beer und Dickens* (27): eine Monohydroxy-cyclohexancarbonsäure beliebiger Art (7 Möglichkeiten der OH-Stellung: 1-OH, cis-2-OH, trans-2-OH, cis-3-OH, trans-3-OH, cis-4-OH und trans-4-OH) erzeugt bei Kaninchen keine oder nur ganz geringe Benzoessäureausscheidungen, während die drei Tetrahydrobenzoessäuren alle eine eindeutige Aromatisierung erfahren.

Die angeführten Substanzen dürften in der normalen Nahrung kaum als Benzoessäurebildner auftreten. Hingegen ist die Chinasäure oder 1,3,4,5-Tetraoxy-cyclohexancarbonsäure in Kernfrüchten und Beeren verbreitet und 1879 von *Loew* (30) im Heu nachgewiesen. Dieser Autor vermutete bereits, sie könnte im Organismus des Pflanzenfressers in Benzoessäure übergehen. Letzteres ist für den Menschen bewiesen (27, 29a,b). Nach *Bernhard* (28b) wird die Chinasäure vom Hunde grösstenteils unverändert ausgeschieden, führt aber nicht zu vermehrter Benzoessäure.

Für eine Aromatisierung der Chinasäure im Stoffwechsel des Menschen sind viele Belege vorhanden. Schon 1863 wurde von *Lautemann* (31) eine Arbeit über diese Frage publiziert. 1951 konnten *Beer, Dickens* und *Pearson* diese Aromatisierung beim Menschen, jedoch nicht bei Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Katzen nachweisen.

Wie haben zwei *Meerschweinchen* mit Spezialfutter ernährt und ihnen je 5 g Chinasäure in 6 Tagen mit der Schlundsonde verabreicht. Bei dem einen Tier war die Erhöhung der Benzoessäureausscheidung deutlich, beim anderen kaum merklich (Versuch No. 18). Wir haben darauf den Versuch an drei, mit Spezialfutter ernährten Meerschweinchen wiederholt, indessen das Calciumsalz der Chinasäure in Milch gelöst verabfolgt. Diese wurde immer vollständig ausgetrunken, so dass die Aufnahme quantitativ verlief (Versuch No. 19, 20, 21).

Die Messung der Benzoessäureausscheidung erfolgte unter Zuhilfe-

nahme der Isotopen-Verdünnungsmethode mit ^{14}C -Carboxyl signierter Benzolcarbonsäure (Tabelle 8).

Tabelle 8

Tier	Dauer Tage	Tot. appl. Chinasäure g	mg/kg die	Zunahme der Benzoessäure- ausscheidung mg	Zunahme in % der appl. Chinasäure
A	9	2,8	930	1119	63
B	11	3,6	680	1637	72
C	12	4,0	1000	1188	47

Auch für unsere Versuche am Menschen wurde eine besondere Diät aus Milch, Haferflocken, Zwieback und Eiern zusammengestellt. Durch diese Ernährungsweise konnte die normale Benzoessäureausscheidung der Versuchspersonen auf einen ziemlich konstanten Wert von 150–200 mg pro Tag reduziert werden. Nach oraler Applikation von 6 bzw. 3g Chinasäure wurden Zunahmen der Benzoessäureausscheidung von 3,14 und 1,25 g festgestellt, welche 82 bzw. 65 % der eingenommenen Menge Chinasäure entsprechen (Versuch 22, 23).

D. Diskussion der Ergebnisse

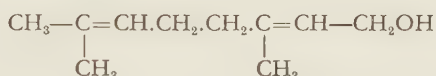
Ausgehend von der Annahme, Benzoessäure könnte durch Dehydrierung hydroaromatischer Verbindungen der Nahrung entstehen, wurde bei Meerschweinchen und Ratten durch Gaben schweren Wassers die Körperflüssigkeit an D_2O angereichert und unter solchen Bedingungen deuterierte Benzoessäure erhalten. Da Benzoessäure ihre Wasserstoffatome unter biologischen Bedingungen nicht austauscht, darf aus dem genannten Befund auf die Möglichkeit ihrer Entstehung durch Aromatisierung geschlossen werden. Hexahydrobenzoessäure führt gleichfalls zur Ausscheidung stark D-haltiger Benzoessäure; erhält eine Ratte, deren Körperflüssigkeit D_2O -haltig ist, täglich kleine Mengen Benzoessäure, so wird damit eine deutliche Herabsetzung des D-Gehaltes der im Harne ausgeschiedenen Benzolcarbonsäure bewirkt, indem durch Aromatisierung entstehende Deuterio-Benzoessäure durch die nicht signierte, zugefütterte verdünnt wird.

In der Annahme, dass im Heu hydroaromatische Verbindungen, z. B. Chinasäure vorliegen können, erhielten Versuchstiere wässrige Heuextrakte und extrahierte Heu-Rückstände, wobei eine Vermehrung der Benzoessäure auftrat.

Schliesslich haben wir Chinasäure verfüttert und auch für das Meerschweinchen eine stattfindende Aromatisierung zu Benzoessäure bewiesen. Durch Versuche an Menschen bestätigten wir die kürzlich publizierten Befunde von *Beer* und *Dickens* über Benzoessäure-Bildung aus Chinasäure.

IV. BEEINFLUSSUNG DER BENZOESÄURE-BILDUNG DURCH GERANIOL

Geraniol gehört zu den höheren ungesättigten Alkoholen, es bildet einen Hauptbestandteil des Rosenöls, des Geraniumöls etc.



In einer 1940 erschienenen Arbeit über die Hydrierung ungesättigter Stoffe im Tierkörper berichten *Fischer* und *Bielig* (32) von einer ungewöhnlich hohen Benzoessäureausscheidung durch Kaninchen bei intramuskulärer Injektion von Geraniol. Die Autoren applizierten an 2 Kaninchen im Verlaufe von 4 Tagen 17,2 g Geraniol. Aus 1,8 l Harn isolierten sie ausser etwa 4 g Hildebrandtsäure 5,5 g Benzoesäure, was einer täglichen Ausscheidung von 690 mg entspricht. Die Autoren vermuteten eine Beeinflussung des normalen Stoffwechsels durch die verabreichte Substanz und verweisen auf eine 1938 von *Grundmann* und *Loew* (33) publizierte Arbeit über das Schicksal teilweise hydrierter, aromatischer Verbindungen im Tierkörper. Diese Autoren erwähnen ebenfalls eine „um mehrere Grössenordnungen gesteigerte Ausscheidung von Benzoessäure bei gleichzeitiger Verfütterung von Substanzen, welche selbst nicht als Benzoessäure ausgeschieden werden können“.

Wir applizierten an Kaninchen ein durch Vakuumdestillation gereinigtes Geraniol oral und subcutan. Intramuskuläre Injektion wurde sehr schlecht ertragen. Für jedes Tier bestimmten wir die Benzoessäureausscheidung mit und ohne Geraniol und erhielten folgende Ergebnisse: *

Tabelle 9

Versuch No.	Dauer Tage	Geraniol ml	Benzoessäure, mg/Tag	
			Kontrollen	Geraniol- Tiere
24	7	oral 13	152	320
25	6	subc. 4	134	55

Wir haben noch geprüft, ob vielleicht durch Geraniol eine Beeinflussung des normalen Phenylalaninstoffwechsels stattfindet und zu diesem Zweck einem Kaninchen gleichzeitig Geraniol und ring-deuteriertes Phenylalanin (17,9 Atom % D) oral verabreicht (Versuch No. 26). Die Applikation des Geraniols begann 2 Tage vor derjenigen des Phenylalanins. Es wurde keine Erhöhung der Benzoesäureausscheidung festgestellt und der Deuteriumgehalt der ausgeschiedenen Benzoesäure von 0,07 At. % war von der gleichen Grössenordnung wie bei den früheren Versuchen.

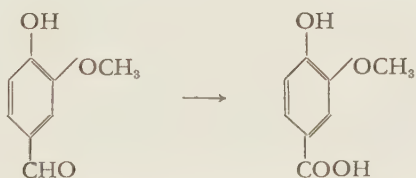
Diskussion der Ergebnisse

Geraniol, subcutan oder oral in grossen Mengen an Kaninchen verabreicht, führte nicht zu erhöhter Benzoesäure-Ausscheidung. Die Befunde von *Fischer* und *Bielig* konnten nicht bestätigt werden. Eine Beeinflussung des Phenylalanin-Stoffwechsels durch die Geraniolgaben im Sinne stärkerer Benzoesäure-Bildung aus der Aminosäure liess sich gleichfalls nicht zeigen.

V. BENZOESÄURE-BILDUNG AUS VANILLIN

Eine in der Pflanzenwelt sehr verbreitete Struktur ist der aromatische 6-Ring mit einem Kohlenstoff- und zwei Sauerstoffsubstituenten (Ligninkomponenten). Es ist anzunehmen, dass bei solchen Substanzen einige H-Atome des Ringes eine Bindung von beschränkter Stabilität aufweisen (aus Analogie zum Tyrosin mit zwei semilabilen H-Atomen in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe (21), ein H-Austausch wäre also möglich. Eine Ausscheidung ähnlicher Substanzen als Benzoessäure wurde jedoch unseres Wissens nie nachgewiesen.

Substituierte Benzoessäuren und Phenylelessigsäuren verlieren im intermediären Stoffwechsel die Substituenten meistens nicht. So werden Tolylsäuren und Tolylessigsäuren unverändert ausgeschieden, ebenso die Xylylsäuren. *Vanillin* geht im Tierkörper in Vanillinsäure über.



Wir haben trotzdem die Benzoessäureausscheidung des Meerschweinchens nach Applikation von Vanillin geprüft. Durch Anwendung von Spezialfutter wurde die Grundausscheidung stark vermindert, so dass auch eine geringe Vermehrung der Harnbenzoessäure nachweisbar sein musste. Das Resultat war negativ (Versuch No. 27).

VI. MÖGLICHE BENZOESÄURE-ENTSTEHUNG AUS KLEINEN BRUCHSTÜCKEN DES STOFFWECHSELS

Nachdem Phenylalanin zu den essentiellen Aminosäuren zählt, also von Mensch und Tier nicht aufgebaut werden kann, bestehen für eine mögliche Benzoessäure-Bildung unter Mitwirkung eines C_2 -Bruchstückes z. B. Acetates nur geringe Chancen. Wir haben gleichwohl an Ratten und Meerschweinchen Acetat-1- ^{14}C appliziert und die Aktivität der sorgfältig gereinigten Harn-Benzoessäure geprüft.

Eine Ratte, welche Na-Acetat ($6,25 \cdot 10^8$ c/min.) oral erhielt (Versuch No. 28), schied keine aktive Benzoessäure aus. Im Harne von zwei Meerschweinchen, denen Acetat subcutan injiziert wurde ($5,6 \cdot 10^8$ c/min. bzw. $8,16 \cdot 10^8$ c/min.), fanden wir gleichfalls keine aktive Benzoessäure, während Fettsäuren, Cholesterin etc. merkliche Aktivitäten aufwiesen (Versuch No. 29, 30). Schliesslich fütterten wir einem Meerschweinchen, dessen Körperwasser an D_2O angereichert wurde (2,25 At. % D), etwas ^{14}C -Acetat ($5,6 \cdot 10^8$ c/min.) und erhielten wohl Deuterio-Benzoessäure (0,67 At. %) aber *keine C-signierte Benzolcarbonsäure*, während die Fettsäuren und Cholesterin sich in üblicher Weise als aktiv erwiesen (Versuch No. 31).

VII. STOFFWECHSEL VON CARBOXYL-¹⁴C-BENZOESÄURE

Im Zusammenhang mit den vorstehend geschilderten Versuchen hielten wir es für angezeigt zu prüfen, ob Benzoesäure mit Ausnahme der möglichen Paarungen mit Aminosäuren vom Organismus überhaupt nicht angegriffen werden kann. Durch Fütterung einer Carboxyl-¹⁴C-signierten Benzolcarbonsäure unter genauer Kontrolle der Expirationskohlendioxid und durch bilanzmässige Erfassung der im Harn und in den Faeces ausgeschiedenen Aktivitäten durfte eine Beantwortung dieser Frage erwartet werden.

Wir haben zwei Versuche mit Benzoesäure-Carboxyl-¹⁴C an Ratten durchgeführt und gefunden, dass praktisch keine Radioaktivität in der Ausatemluft erscheint.

Beim ersten Versuch (Versuch 32) injizierten wir $734 \cdot 10^5$ c/min. subcutan. Etwa 90% dieser Aktivität fanden wir nach 24 Std. im Harn wieder auf. Nach unseren Messungen muss weniger als 1% der applizierten Menge Benzoesäure im Körper zurückgeblieben sein.

Ein zweiter Versuch (Versuch 33) bei oraler Applikation von $771 \cdot 10^5$ c/min. und Auffangen des Harnes während 3 Tagen ergab analoge Resultate:

Tabelle 10

Vers. No.	Dauer Tage	Wiederaufgefundene Aktivität in % der applizierten Aktivität			
		Faeces	Carcass	Ausatmungs- CO ₂	Harn
32	1	—	0,7	0,04	90,7
33	3	0,4	1,7	0,18	87,8

Durch Papierchromatographie einiger Harnproben und Auszählung der Chromatogramme konnten wir zeigen, dass die Radio-

aktivität des Harnes von der Hippursäure und der Benzoessäure stammte. Eine exakte Erfassung der verabreichten Aktivität in dem Sinne, dass dieselbe zu 100 % wieder aufgefunden werden könnte, gelingt offenbar nur schwer. Wir konnten insgesamt 91,4 bzw. 89,9 % nachweisen.

Nach oraler Applikation (am Menschen) von 1 g Deuterio-Benzoesäure mit 0,48 At. % D isolierten wir aus dem Harn der Versuchspersonen 2,65 g Hippursäure von 0,15 At. % D oder 83 % der applizierten Signierung. Es handelte sich dabei bereits um umkristallisierte Hippursäure und auch aus der Nachperiode konnte noch D-haltiges Produkt gewonnen werden. Die angegebene Ausbeute stellt also einen Minimalwert dar (Versuch No. 34).

Zur Ergänzung dieses Versuches verabreichten wir einem Meerschweinchen gleichzeitig Deuterio-Benzoesäure und radioaktive Benzoessäure in bekanntem Verhältnis. Die aus dem Harn isolierte Benzoessäure musste, wenn kein Austausch der H-Atome erfolgt war, trotz der Verdünnung durch körpereigene Benzoessäure das gleiche Verhältnis von Deuterium zu ^{14}C aufweisen. Trotz der verhältnismässig grossen Fehlerbreite der Messmethode bei kleinen D-Werten bzw. Aktivitäten ist durchaus ersichtlich, dass ein H-Austausch innerhalb der Benzoessäuremolekel nicht erfolgt (Versuch No. 35).

Tabelle 11

Dauer Tage	Benzoessäure appl.		Benzoessäure isol.		Verhältnis D/ ^{14}C	
	D- Gehalt	Aktivität	D- Gehalt	Aktivität	appl.	isol.
6	At. % D 0,61	c/min. 18550	At. % D 0,28	c/min. 7530	33	37

(Als „Verhältnis“ wurde die 2stellige Zahl gesetzt, welche durch Division des Deuteriumgehaltes in At. % durch die Aktivität in c/min. mg Substanz ohne Komma-Setzung erhalten wird).

EXPERIMENTELLER TEIL

A. ALLGEMEINES

Durchführung der Stoffwechselversuche

1. Versuche am Menschen

Wo keine spezielle Diät angeführt ist, wurde die normale Kost während des Versuches beibehalten. Möglicherweise mit Benzoesäure konservierte Nahrungsmittel wurden gemieden, Gemüse- und Obstkonsum eingeschränkt.

Die Tagesharn wurden jeweils sofort eingengt, die Konzentrate vereinigt und bis zur weiteren Verarbeitung im Eisschrank aufbewahrt.

2. Versuche an Kaninchen

Ausgewachsene Kaninchen erhielten täglich Heu, Rüben und Haferkörner, ausserdem jede Woche einmal Grünfutter (Spinat, Salat etc.). Mindestens 3 bis 4 Tage vor Beginn und während der Stoffwechselversuche wurden die Tagesrationen nach Möglichkeit konstant gehalten, je nachdem nur wenig oder gar kein Heu gegeben, dafür täglich etwa 200 g Grünfutter.

Füttert man Kaninchen nur mit Rüben, Haferkörnern und Weissbrot, so sinkt die Grundausscheidung der Benzoesäure wohl beträchtlich, aber nach kurzer Zeit fällt die Gewichtskurve des Tieres steil ab. Wir haben daher diese Ernährungsweise nicht angewendet.

3. Versuche an Meerschweinchen

War eine normale Benzoesäureausscheidung erwünscht, so erhielten die Tiere Heu, Rüben, Milch und wenig Haferkörner. Musste die

Grundausscheidung der Benzoesäure klein bleiben, so wurden ausser Milch und wenig Rüben spezielle Futterkuchen folgender Zusammensetzung verfüttert:

Haferflocken	63 Gewichtsteile
Trockenmagermilch	30 „
Kochsalz	4 „
Trockenhefe	4 „
Wasser	

Ausserdem erhielten alle Tiere täglich Vitamin C in Form von Orangensaft. Abweichende Futterzusammenstellungen sind bei dem betreffenden Versuch vermerkt.

Die Stoffwechselkäfige, Gläser von ca. 25 cm Durchmesser mit trichterförmigem Boden und Drahtnetzeinsatz wurden zweimal täglich gewechselt und mit n/10-Salzsäure gespült. Dieses Vorgehen ermöglicht ein weitgehend quantitatives Auffangen des Harnes.

Harn und Spülwasser wurden vereinigt, angesäuert, filtriert und unter Äther im Eisschrank aufbewahrt.

Harnaufarbeitung auf Benzoesäure

Die Bestimmung der Benzoesäure erfolgte bei allen Versuchen durch Isolierung oder mit Hilfe der Isotopen-Verdünnungsmethode, also durch Zugabe bekannter Mengen radioaktiver Benzoesäure. Auf eine kolorimetrische Bestimmung, z. B. nach *Dickens* (22) haben wir verzichtet.

Der gesammelte Harn und das Käfigspülwasser wurden im Wasserstrahlvakuum alkalisch auf etwa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{5}$ des ursprünglichen Harnvolumens eingengt bei einer Badtemperatur von 30–40° C. Das Konzentrat wurde mit Salzsäure kongosauer gemacht und in einem mit Rührvorrichtung versehenen Extraktor nach Kutscher-Steudel während 20 Std. mit Äther extrahiert. Nach Abdestillieren des Aethers haben wir den Extrakt mit einem Überschuss an 3-normaler Natronlauge während 3–4 Std. verseift und nach Ansäuern mit Salzsäure einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Das Wasserdampfdestillat wurde alkalisch auf wenige ccm eingengt, angesäuert und die ausgefallene Benzoesäure abfiltriert. Das Filtrat wurde in das De-

stilliergefäß zurückgegeben und der Prozess solange wiederholt, bis das Wasserdampfdestillat keine Benzoesäure mehr enthielt. Die rohe Benzoesäure wurde in einem nicht evakuierten Exsikkator über CaCl_2 getrocknet und dann im Hochvakuum bei $70-90^\circ$ Badtemperatur sublimiert. Das so vorgereinigte Produkt war indessen nicht analysenrein, für Deuterium- und Radioaktivitätsbestimmungen wurde es noch aus Petroläther und Wasser (mit etwas Tierkohle) umkristallisiert und erneut sublimiert. Die in den Versuchen angegebenen Ausbeuten beziehen sich aber auf das nach der ersten Sublimation ermittelte Gewicht der Benzoesäure.

Versuche mit Benzoesäure- C^{14}

Einige dieser Versuche sind Bilanzversuche. Wir haben die totalen Aktivitäten der Ausatemungsluft, des Harnes und der Faeces durch Auszählen der erhaltenen BaCO_3 -Proben bestimmt. Die im Körper verbliebene Aktivität wurde aus den Werten der Gesamtlipide und des Trockenrückstandes berechnet.

Das Versuchstier befand sich in einem geschlossenen Stoffwechselkäfig, durch welchen ein konstanter schwacher Luftstrom strich. Durch zwei vorgeschaltete Adsorptionssäulen mit ca. 5-normaler Natronlauge wurde die Luft vor ihrem Eintritt in den Käfig von CO_2 befreit. Die Ausatemungskohlensäure gab der Luftstrom nach Austritt aus dem Stoffwechselgefäß an zwei weitere Kolonnen mit 5-normaler Kalilauge ab. Ein Quetschhahn vor dem Unterdruckgefäß am Ende der Apparatur ermöglichte die Regulierung der durchgesaugten Luftmenge. Fällung des Carbonats mit Bariumchloridlösung. Der periodisch gesammelte und mit dem Käfigspülwasser vereinigte Harn wurde auf ein bekanntes Volumen ergänzt und davon ein aliquoter Teil feucht verascht. Die Faeces haben wir mit dem Käfigspülwasser kurz abgespült, über Phosphorpentoxyd getrocknet, gewogen und pulverisiert.

Die Tiere wurden mit Äther oder Leuchtgas getötet, der Magen-Darm-Trakt herausgeschnitten und der Carcass mittelst einer Hackmaschine zerkleinert. Hackgut und Magen-Darm-Trakt haben wir vereinigt und dreimal mit der doppelten Menge Aceton, bezogen auf 70% Körperwasser, ausgezogen. Die vereinigten Acetonphasen

wurden durch Destillation vom Aceton befreit, der Trockenrückstand im Soxhlet mit Äther erschöpfend extrahiert, der Äther abdestilliert und der Extrakt mit dem wässrigen Rückstand der Acetonextraktion vereinigt. Nun wurde mit Äther ausgeschüttelt, die ätherische Phase mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Den im Vakuum auf Gewichtskonstanz gebrachten Rückstand bezeichnen wir im folgenden als *Gesamtlipide*. Sie wurden mit der doppelten Menge methanolischer Kalilauge verseift und mit Äther das Unverseifbare gewonnen. Die wässrige Phase wurde mit 4-normaler Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Nach dem Abdampfen derselben ergaben sich die Fettsäuren.

Die einzelnen Proben wurden in Anlehnung an die Methode von *van Slyke* nass verbrannt und als BaCO_3 gemessen.

Gewinnung von deuteriertem Phenylalanin

1. *Deuterio-Schwefelsäure*: Aus käuflichem Oleum mit ca. 60% SO_3 wurde in einer Glasapparatur mit ungefetteten Schliffen und Gasfalle SO_3 in eine eisgekühlte und mit wenigen ccm reiner Schwefelsäure beschickte Vorlage destilliert (Übergang 36–60° C). Das so erhaltene, farblose SO_3 wurde alsdann in eine eisgekühlte Vorlage mit schwerem Wasser destilliert (Übergang konst. 44° C). Durch Verdünnen mit einer berechneten Menge Deuteriumoxyd entstand eine 82%ige Deuterioschwefelsäure.

2. *Deuterio-DL-Phenylalanin*: Wir benützten die Methode von *Moss* und *Schönheimer* (20). Käufliches DL-Phenylalanin „Roche“ wurde in einer Ampulle mit 4–5 Teilen 82%iger Deuterioschwefelsäure bei gelegentlichem Schütteln 7 Tage auf 50° C erwärmt. Dann wurde der Ampulleninhalt mit der dreifachen Gewichtsmenge Wasser verdünnt und die Lösung unter mechanischem Rühren bei 28–30° C tropfenweise mit 9 molarer Natronlauge neutralisiert. Bei pH 5,4 blieb das Gemisch kurze Zeit stehen, worauf wir den Niederschlag abfiltrierten. Das im Filtrat verbliebene Phenylalanin wurde als Kupfersalz ausgefällt und dieses mit H_2S zersetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte durch Umkristallisation aus Wasser bis der Schmelzpunkt konstant blieb. Ausbeute 70–80% der Theorie. Höchster gemessener D-Gehalt: 22,2 At. %, Ausbeute 69%. Niedrigster D-Gehalt: 12,1 At. %, Ausbeute 81% der Theorie.

3. *Deuterio-D- und Deuterio-L-Phenylalanin*: Die Trennung des Racemates erfolgte nach *Fischer* und *Schoeller* (23) über das Brucinsalz des Formyl-DL-Phenylalanins. Die Darstellung von wasserfreiem Brucin gelang nach den Angaben von *E. E. Turner* (24). Man löst Brucin in Chloroform, trocknet zweimal mit Natriumsulfat und giesst die Lösung in viel Petroläther. Es entsteht ein feiner Niederschlag von wasserfreiem Brucin. Formyl-deuterio-DL-Phenylalanin wurde nach *Clarke* bzw. *Du Vigneaud* und *Meyer* (25) gewonnen. Eine 10%ige Lösung von Phenylalanin in Ameisensäure wurde auf 40° C erwärmt und tropfenweise mit Essigsäureanhydrid versetzt (Volumenverhältnis Ameisensäure-Essigsäureanhydrid: 3:1). Die Lösung wurde 15 Min. bei 70° C gehalten, abgekühlt und das Produkt durch Verdünnen mit Wasser ausgefällt. Umkristallisation aus Wasser. Zur Aufspaltung des Racemates lösten wir 10 g Formyl-deuterio-DL-Phenylalanin und 20,4 g wasserfreies Brucin in siedendem Methanol und liessen die Lösung über Nacht im Eisschrank stehen. Das ausgefallene Brucinsalz der D-Form des Phenylalanins wurde aus Methanol umkristallisiert, es liess sich leicht reinigen. Das Brucinsalz der L-Form konnte nur aus einer konzentrierten wässrigen Lösung kristallin erhalten werden. Es wurde aus Wasser umkristallisiert, wobei die Lösungen angeimpft und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt werden mussten. Das Salz kristallisierte langsam aus. Die Gewinnung der freien optisch aktiven Säuren bot weiter keine Schwierigkeiten.

Es wurden erhalten:

D-Phenylalanin: 2,4 g $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +34,5^{\circ}$

L-Phenylalanin: 2,2 g $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -34,0^{\circ}$

(Drehungen in Wasser, 1 dm Rohr. Totalausbeute bezogen auf 10 g Formyl-deuterio-Phenylalanin: 54%).

Gewinnung von Benzolcarbonsäure-C¹⁴

Wir stellten das Präparat nach der Vorschrift von *Dauben, Reid* und *Yankwich* (26) aus Phenylmagnesiumbromid und C¹⁴O₂ her.

Die Grignardverbindung wurde separat unter Stickstoffatmosphäre bereitet. Für die eigentliche Reaktion benützten wir eine Schliffapparatur, bestehend aus einem birnenförmigen Reaktionsgefäss mit gut dichtendem Rührwerk, einer Vorrichtung für die C¹⁴O₂-Ent-

wicklung, einem Quecksilbermanometer, einem Hochvakuummanometer und einer Kühlfalle. Gefäße und Messinstrumente waren über eine Glasbrücke mit mehreren, durch Hahnen abschliessbaren Kugelschliffen an eine Diffusionspumpe angeschlossen. Die Grignardverbindung wurde in das mit Stickstoff gefüllte Reaktionsgefäß eingeführt, mittels flüssiger Luft eingefroren und das ganze Aggregat evakuiert. Nun wurden Diffusionspumpe, Kühlfalle und Hochvakuummanometer von der übrigen Apparatur abgeschlossen und nach Erwärmen der Grignardlösung auf -20°C mit der C^{14}O_2 -Entwicklung aus $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$ und H_2SO_4 begonnen. Das Rührwerk ermöglichte eine schnelle Absorption des C^{14}O_2 . Nach Beendigung der Reaktion (10 Min. Manometeranzeige blieb konstant) wurde etwa noch im toten Raum der Apparatur befindliches C^{14}O_2 durch Einfrieren des Reaktionsgefäßes kondensiert und das Gefäß abgeschlossen. Nach Aufwärmen auf -20°C und kurzem Rühren war die Adsorption vollständig.

Das Reaktionsgemisch haben wir in der üblichen Weise aufgearbeitet. Die Benzoesäure wurde am Hochvakuum sublimiert und zeigte dann auf dem Koflerblock einen sehr scharfen Schmelzpunkt von $122-123^{\circ}$.

Ansatz:	$\text{BaC}^{14}\text{O}_3$ (3,0 g)	15,2 mM
	Phenylmagnesiumbromid	18,45 mM (121 %)
Ausbeute:	a) Benzoesäure (1,39 g)	11,4 mM ($74,8^{\circ}_0$)
	Aktivität: $0,682 \mu\text{C}/\text{mg}$	$= 0,934 \text{ mC}$
	spez. Aktivität: $1,511 \pm$	$0,039 \cdot 10^6 \text{ c/min. mg}$
	b) Benzoesäure (0,25 g)	2,05 mM
	Aktivität: $5,83 \pm 0,03 \cdot 10^5$	c/min. mg

Diese Fraktion erhielten wir durch Elution der Restlaugen mit inaktiver Benzoesäure.

B. VERSUCHE MIT DEUTERIO-PHENYLALANIN

Verabreichung an Kaninchen

1. Orale Verabreichung der optisch aktiven Formen (Versuche No. 3 und 4)

Deuterio-D-Phenylalanin und Deuterio-L-Phenylalanin wurden nacheinander dem gleichen 4 kg schweren männlichen Tier verab-

reicht. Beide Versuche wurden eingeteilt in eine Hauptperiode von 12 Tagen, während welcher 2,2 g D- bzw. 2,12 g L-Phenylalanin von 12,1 At. % D appliziert wurden, eine erste Nachperiode von 3 Tagen und eine zweite Nachperiode von 4 Tagen. Die Verabreichung erfolgte in täglichen Dosen von 200 mg als Chlorhydratlösung mit der Schlundsonde. Die Harnmengen etc. sind aus der Tabelle 12 ersichtlich.

Tabelle 12

	Tage	Harn ccm	Phenyl- alanin g	Benzoe- säure mg	D-Gehalt At. % D
Verfüt. D-	12	1370	2,2	820	0,11
1. Nachper.	3	370		300	0,06
2. Nachper.	4	350		200	0,04
Pause	22				
Kontrolle	6	330		180	0,02
Verfüt. L-	12	790	2,12	1010	0,11
1. Nachper.	3	340		270	0,09
2. Nachper.	4	320		150	0,02

Nach der Verfütterung von D-Phenylalanin wurde eine Pause von 22 Tagen eingeschaltet. Eine Kontrolle des D-Gehaltes der Benzoesäure ergab, dass derselbe nun im Bereiche der Fehlergrenze der Methode lag.

2. Orale Verabreichung von Deuterio-DL-Phenylalanin (Versuch No. 1)

Ein 2,8 kg schweres Kaninchen wurde mit Rüben (300-400 g pro Tag), Spinatblättern (200 g pro Tag) und Haferkörnern gefüttert und zeigte vor Beginn des Versuches eine durchschnittliche tägliche Benzoesäureausscheidung von 190 mg (12 Tage, Harn 2,26 l). Wir applizierten 1 g DL-Phenylalanin von 17,9 At. % Deuterium in 5 Tagesdosen zu 200 mg und sammelten den Harn während 7 Tagen (2,3 l). Am Ende des Versuches wog das Versuchstier 2,65 kg.

Es wurden 1,37 g Benzoesäure mit einem Deuteriumgehalt von 0,02 At. % isoliert.

Verabreichung von Deuterio-DL-Phenylalanin an Meerschweinchen

Es wurden insgesamt 3 Versuche (No. 6, 7, 8) durchgeführt, wobei die Aminosäure entweder der Milch beigemischt oder mit der Schlundsonde als Na-Salz zur Verabreichung gelangte. Die Einzelheiten enthält die Tabelle.

Tabelle 13:

Orale Gaben von Deuterio-DL-Phenylalanin an Meerschweinchen

Vers. No.	Tier		Harn			
	Gewicht g		Hauptperiode		Nachperiode	
	vor	nach	ml	Benzo- säure mg	ml	Benzo- säure mg
6	290	312	479	820	306	440
7	230	318	565	1130	358	603
8	320	390	1700	650	860	313

Versuche am Menschen

1. DL-Phenylalanin oral (Versuch No. 9)

In fünf Tagen nahm die Versuchsperson V. (Körpergewicht 70 kg, Alter 25 J.) 8 g Phenylalanin (21,26 At. % D) als verdünnte Lösung des Chlorhydrates ein (während der ersten 3 Tage je 1 g vor den Hauptmahlzeiten, am 4. und 5. Tag je 1 g vor dem Mittagessen). Normale Diät, 2800–2900 Cal. pro Tag. Dauer der Hauptperiode: 6 Tage, Harnmenge 10 l, Benzoessäure 1,75 g. Dauer der Nachperiode: 4 Tage, Harnmenge 4 l, Benzoessäure 1,21 g.

2. DL-Phenylalanin oral (Versuch No. 10)

Die Versuchsperson U. G. (Gewicht 78 kg, Alter 25 J.) nahm 2 g Phenylalanin von 16,0 At. % D ein (2 Portionen zu 1 g während der Hauptmahlzeit). Auch hier wurde die normale Kost beibehalten. Hauptperiode 3 Tage (2,7 l Harn), Nachperiode 2 Tage (1,7 l Harn). Wir isolierten hier direkt die Hippursäure. Für die Hauptperiode fanden wir 3,7 g rohe Hippursäure (einmal umkrist.). Nach mehr-

maliger Umkristallisation aus Wasser erhielten wir 1,95 g reine Säure von konstantem Smp. (187° Koflerblock). D-Gehalt: 0,04 At. %.

Wir verseiften eine Probe mit 3 n NaOH und erhielten nach der üblichen Reinigung eine Benzoesäure vom Smp. 122–123°. Sie hatte einen Deuteriumgehalt von 0,05 At. % (Fehlerbreite der Messung $\pm 0,02\%$). Aus dem Harn der Nachperiode gewannen wir 2,2 g rohe Hippursäure und daraus 1,05 g reine Säure.

3. *DL-Phenylalanin oral* (Versuch No. 11)

Die Versuchsperson R. V. (Gewicht 72 kg, Alter 24 J.) nahm 2,8 g Phenylalanin von 16,0 At. % D in 3 Tagen ein (zweimal 1 g und einmal 0,8 g). Während der 3 Versuchstage wurden 3,7 l Harn gesammelt. Bei der Ätherextraktion des sauren Harnkonzentrates im Rühr-extraktor kristallisierte die Hippursäure in langen Nadeln an den Wänden der Vorlage aus. Rohe Hippursäure (einmal umkrist.): 3,57 g. Durch Behandlung mit Tierkohle und mehrmaliger Umkristallisation aus Wasser erhielten wir reine Hippursäure (1,79 g, Smp. 187°). Sie hatte einen Deuteriumgehalt von 0,06 At. %. Nach Verseifung und üblicher Aufarbeitung lag reine Benzoesäure vor (Smp. 122–123°).

C. BENZOESÄURE-BILDUNG DURCH AROMATISIERUNG

1. *Benzoesäure-Ausscheidungen von Meerschweinchen nach vorangehender Anreicherung des Körperwassers an D₂O*

a) Versuch No. 12

Ein 380 g schweres, männliches Meerschweinchen erhielt während den ersten 2 Versuchstagen 3 subcutane Injektionen von je 3 ml D₂O und ad libitum Trinkwasser mit 4 % D₂O. Das Futter bestand aus Heu und Hafer. Am 4. Tag betrug das Körpergewicht noch 330 g, blieb indessen bis zum 15. Tag konstant. Nach 18 Tagen wurde das Tier getötet. Aus der Leber isolierten wir in üblicher Weise 110 mg Lipide, aus dem Harne (ohne Verseifung) 540 mg Benzoesäure. Vom Körperwasser, der Benzoesäure und den Leberlipiden bestimmten wir den D-Gehalt.

b) Versuch No. 13

Ein 560 g schweres, männliches Tier erhielt am ersten Versuchstag 2 Injektionen à 2,5 ccm D_2O und am zweiten Versuchstag 2 Injektionen à 2 ccm D_2O , also insgesamt 9 ccm D_2O und Trinkwasser mit 3–4 ‰ D_2O . Ausser Heu und Hafer erhielt das Tier täglich 10 g Rüben. In den ersten 3 Versuchstagen nahm das Gewicht des Tieres auf 490 g ab und blieb dann einigermaßen konstant. Versuchsdauer 35 Tage. Die Aufarbeitung des Tieres erfolgte wie oben angegeben. Aus 188 ccm Harn isolierten wir 470 mg Benzoesäure, aus der Leber 110 mg Lipide und aus dem restlichen Körper (Carcass und Magen-Darm-Trakt) 10 g Lipide. Messung der D-Gehalte dieser Fraktionen.

2. *Orale Applikation von Benzoesäure bzw. Hexahydrobenzoesäure an Ratten nach Anreicherung der Körperflüssigkeit mit D_2O* (Versuch No. 14)

Anreicherung der Körperflüssigkeit an D_2O bei einer 245 g schweren, weiblichen Albinoratte auf 2,86 At. ‰ D. Das Futter bestand aus trockenem Schwarzbrot, Trockenmilch und Maiskörnern, wobei wir während der ersten 30 Versuchstage täglich 10 mg Benzoesäure verabreichten. Die Harnmenge von 33 Tagen betrug 634 ml und lieferte 311 mg Benzoesäure.

Am 33. Tage applizierten wir dem Tier peroral als Na-Salz mit Milch 150 mg reine Hexahydrobenzoesäure. Diese Dosis wurde bis zum 37. Tage wiederholt, so dass das Tier insgesamt 750 mg Hexahydrobenzoesäure aufnahm. Aus der Harnmenge von 7 Tagen (100 ml) erhielten wir 100 mg reine Benzoesäure.

3. *Fütterung von Heu-Extrakten an Meerschweinchen* (Versuche No. 15 und 16)

a) 200 g lufttrockenes Heu wurden im Turmix zerkleinert und anschließend in Wasser so fein zerteilt, als es die Maschine erlaubte. Nach 24 Stunden wurde die Suspension durch ein Sehtuch grob filtriert, das Filtrat (ca. 4 l) durch Zentrifugieren so weit als möglich geklärt und im Vakuum eingedampft, wobei das Destillat für die zweite Extraktion des Heues diente (2 Std. bei 70°). Die Extrakte wurden vereinigt. Den Heu-Rückstand vermengten wir mit 60 g Trockenmagermilchpulver, 6 g Trockeneiweiss, 4 g Kochsalz und Wasser. Aus dieser Masse formten wir Brötchen und trockneten sie

bei 80–100°. Der konzentrierte wässrige Extrakt, ein brauner Sirup, wurde mit 120 g Haferflocken, 60 g Trockenmagermilchpulver, 6 g Trockeneiweiss und ca. 4 g Kochsalz angerührt und die Masse auf Uhrgläsern im Trockenschrank getrocknet. Diese Heuextrakt und -rückstand enthaltenden Kuchen wurden an je 2 Meerschweinchen, die einige Tage zuvor mit Spezialfutter ernährt wurden, verfüttert (siehe S. 28). Der Harn wurde wie üblich aufgearbeitet.

b) 400 g desselben Heues wurden mit 2,5 l 4 n HCl versetzt und die Mischung unter mechanischem Rühren 2 Std. bei 80–90° C gehalten. Der unlösliche Rückstand (I) wurde abfiltriert und dreimal mit ca. 3 l Wasser heiss extrahiert. Die Filtrate (II) wurden vereinigt, der Rückstand (I) über CaCl_2 getrocknet (194 g gewichtskonstant) und im Soxhlet mit Äther extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels blieben 12,5 g einer dunkelgrünen, wachsartigen Paste: Fraktion B. Die unlöslichen Anteile des Heues wogen 181 g: Fraktion A. Die verdünnte, salzsaure Extraktionslösung (II) wurde auf 700 ccm eingeeengt und nach erschöpfender Extraktion mit Äther, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Zur vollständigen Entfernung der Salzsäure wurde der Extrakt im Exsikkator über NaOH aufbewahrt. Wir erhielten 160 g eines braunschwarzen Pulvers: Fraktion C.

Die Meerschweinchen, 400–600 g schwere, männliche Tiere, wurden mindestens schon 6 Tage vor Beginn der Applikation mit Spezialfutter ernährt. Die Versuchsdauer richtete sich nach der Menge der zu verfütternden Substanz. Die ausgeschiedene Benzoessäure bestimmten wir durch Isolierung und aus der Verdünnung einer bekannten Menge oral applizierter, radioaktiver Benzoessäure (etwa 10 mg à $1,51 \cdot 10^6$ c/min. mg). Die erhaltenen Werte zeigten eine befriedigende Übereinstimmung.

4. Versuche mit Chinasäure

Orale Verabreichung an Meerschweinchen

Chinasäure Smp. 171–173° C. $[\alpha]_D^{20} = -43,7^\circ$

<i>Analyse:</i> berechnet	C 43,75 %	H 6,29 %
gefunden	C 43,49 %	H 6,26 %

(Versuch No. 18): Wir haben eine wässrige Lösung von 5 g Chinasäure mit NaOH auf pH 5 gebracht und einem weiblichen 260 g schweren Meerschweinchen mit der Schlundsonde verabreicht. Die

Versuchsdauer betrug 6 Tage. Wir konnten eine Zunahme der Benzoesäureausscheidung gegenüber der Kontrolle von 605 mg feststellen.

Drei Meerschweinchen wurden in 6 Tagen an die Bedingungen des Stoffwechselkäfigs und des Spezialfutters angewöhnt. Vom 7. Tage an wurden täglich 400 mg Chinasäure als Ca-Salzlösung unter die Milch gemischt. Die signierte Benzoesäure wurde separat mit der Kugelpipette verabreicht. Die Benzoesäureausscheidung (Haupt- und Nachperiode) wurde sowohl nach der Isolierungsmethode als auch nach der Verdünnungsmethode bestimmt.

(Versuch No. 19): Das männliche Meerschweinchen A war am Anfang des Versuches 430 g schwer, am Ende des Versuches wog es 571 g.

a) *Hauptperiode* (Dauer 9 Tage, Harnmenge 690 ccm)

Chinasäure total appliziert: 2,8 g (400 mg/d)

Benzoessäuresignierung: 111,29 mg = $1,407 \cdot 10^7$ c/min.

Aus dem Harn isolierte Benzoessäure: 1304 mg

Aus deren Aktivität ber. Menge: 1265 mg

b) *Nachperiode* (Dauer 9 Tage, Harnmenge 818 ccm)

Benzoessäuresignierung: 110,63 mg = $1,493 \cdot 10^7$ c/min.

Aus dem Harn isolierte Benzoessäure: 130 mg

Aus deren Aktivität ber. Menge: 145 mg.

Die Zunahme der Benzoesäureausscheidung in der Hauptperiode, ausgedrückt als Ausbeute bezogen auf die verfütterte Chinasäure beträgt:

Isolierungsmethode: 66 % der Applikation

Verdünnungsmethode: 63 % der Applikation.

(Versuch No. 20): Das männliche Meerschweinchen B wog zu Beginn des Versuches 588 g, bei Versuchsende 684 g.

a) *Hauptperiode* (Dauer 11 Tage, Harnmenge 900 ccm)

Chinasäure total appliziert: 3,6 g (400 mg/Tag)

Benzoessäuresignierung: 110,47 mg = $1,39 \cdot 10^7$ c/min.

Aus dem Harn isolierte Benzoessäure: 1766 mg

Aus deren Aktivität ber. Menge: 1790 mg

b) *Nachperiode* (Dauer 11 Tage, Harnmenge 1049 ccm)

Benzoessäuresignierung: 109,74 mg = $1,42 \cdot 10^7$ c/min.

Aus dem Harn isolierte Benzoessäure: 123 mg

Aus deren Aktivität ber. Menge: 151 mg

Ausbeuten bezogen auf applizierte Chinasäure: 72 %.

(Versuch No. 21): Das weibliche Meerschweinchen C wog zu Beginn des Versuches 402 g, bei Versuchsende 482 g.

a) *Hauptperiode* (Dauer 12 Tage, Harnmenge 858 ccm)

Chinasäure total appliziert: 4,0 g (400 mg/Tag)

Signierung Benzoessäure: 113,94 mg = $1,9 \cdot 10^7$ c/min.

Aus dem Harn isolierte Benzoessäure: 1208 mg

Aus deren Aktivität ber. Menge: 1343 mg

b) *Nachperiode* (Dauer 13 Tage, Harnmenge 1323 ccm)

Benzoessäuresignierung: 110,22 mg = $1,44 \cdot 10^7$ c/min.

Aus dem Harn isolierte Benzoessäure: 177 mg

Aus deren Aktivität ber. Menge: 151 mg

Ausbeuten an Benzoessäure bezogen auf applizierte Chinasäure 47%.

Versuche am Menschen

Versuch No. 22.

Die Versuchsperson J. V. (71 kg) erhielt täglich folgende Diät:

1 Ei (ca. 50 g)	150 g Haferflocken
2 kg Milch	50 g Zwieback
20 g Butter	100 mg Vitamin C
50 g Zucker	

Die Umstellung auf Diät erfolgte ca. 35 Stunden vor Beginn des Versuches. Die applizierte Chinasäure war das oben beschriebene Präparat. Aus dem Harn der ersten 2 Versuchstage (48 Std.) ermittelten wir ein erstes Mal die Grundausscheidung. Nach 48, 72 und 96 Stunden wurden je 3 g Chinasäure eingenommen (also am Anfang des 3., 4. und 5. Tages), der Harn jedoch nur von der 72. bis zur 120. Stunde (4. und 5. Tag) gesammelt. Verschleppungen der Benzoesäureausscheidung über 24 Std. sind auf diese Weise ungefähr ausgeglichen. Der Harn des 6. Versuchstages wurde separat gesammelt (121. bis 144. Std.). Der 7. und 8. Versuchstag ergaben eine zweite Bestimmung der Grundausscheidung (vgl. Tab. 14).

Durchschnittliche Grundausscheidung (abzüglich Signierung): 375 mg.

Zunahme der Ausscheidung in der Hauptperiode: 3142 mg.

Ausbeute bezogen auf 6 g Chinasäure: 82 %.

(Die Signierung wurde dem Harnextrakt nach der Verseifung beigefügt.)

Tabelle 14

Tag	Harn l	Chinasäure g	Ausgeschiedene Benzoessäure abz. Signierung	
			Isolierung mg	Aus Aktivität ber. mg
1	1,48		363	341
2	0,96			
3	1,50	3		
4	1,51	3	3788	3517
5	1,62	3		
6	1,43		242	235
7	1,32		413	409
8	1,37			

Versuch No. 23.

Die Versuchsperson G. B., 61 kg, Alter 31 J., erhielt 3 g Chinasäure am 3. Versuchstag (morgens und abends je 1,5 g). Die im vorhergehenden Versuch beschriebene Diät wurde auch hier eingehalten. Vor-, Haupt- und Nachperiode dauerten je 2 Tage. Gesamte Versuchsdauer 6 Tage.

Tabelle 15

Tag	Harn l	Chinasäure g	Ausgeschiedene Benzoessäure abz. Signierung	
			Isolierung mg	Aus Aktivität ber. mg
1	1,74			
2	1,70		309	281
3	1,87	3		
4	1,83		1649	1544
5	1,52			
6	1,28		318	295

Durchschnittliche Grundausscheidung abzüglich Signierung: 288 mg (Werte der Verdünnungsmethode).

Zunahme der Ausscheidung in der Hauptperiode: 1249 mg

Ausbeute bezogen auf 3 g applizierte Chinasäure: 65 %.

D. GERANIOL

1. Orale Applikation (Versuch No. 24)

Einem 2,6 kg schweren Kaninchen wurde bei normalem Futter (Heu, Rüben, Hafer und Wasser) im Verlaufe von 5 Tagen 13 ccm Geraniol mit der Schlundsonde verabreicht (einmal 2 ccm oder zweimal 1,5 ccm im Tag) und der Harn von 7 Tagen gesammelt. Aus 1515 ml erhielten wir 2,24 g Benzoessäure. Während einer anschließenden Nachperiode von 7 Tagen wurden aus 1175 ml Harn 1,27 g Benzoessäure isoliert.

2. Subcutane Injektion (Versuch No. 25)

Ein 3,1 kg schweres, männliches Kaninchen schied, bei normaler Fütterung während 8 Tagen, bei einer totalen Harnmenge von 1025 ccm 1,07 g Benzoessäure aus. Am 9. und 10. Tag erhielt das Tier je 2 Injektionen von 1 ccm Geraniol, also insgesamt 4 ccm subcutan. Der Harn von 6 Tagen (260 ccm) ergab 330 mg Benzoessäure. Gewicht des Tieres 2,95 kg.

3. Orale Applikation von Geraniol und Deuterio-DL-Phenylalanin (Versuch No. 26)

Ein 2,9 kg schweres, männliches Kaninchen schied während der ersten 4 Tage des Versuches, bei normalem Futter 870 mg Benzoesäure oder täglich 218 mg aus. Es erhielt am 5. und 6. Tag zur Angewöhnung 2,2 bzw. 3 ccm Geraniol mit der Schlundsonde, ohne daß der Harn untersucht wurde. Darauf wurden vom 7.–10. Tag 9,5 ccm Geraniol und 1,0 g Phenylalanin als Chlorhydratlösung oral appliziert und der Harn bis zum 12. Tag gesammelt. Es konnten daraus 840 mg Benzoessäure isoliert werden, d.h. 140 mg pro Tag. Das applizierte Deuterio-DL-Phenylalanin hatte einen Deuteriumgehalt von 17,9 At. %, die aus dem Harn isolierte Benzoessäure nach der üblichen Reinigung einen solchen von 0,07 At. %.

E. VANILLIN

Orale Vanillingaben an Meerschweinchen (Versuch No. 27)

Einem 390 g schweren, männlichen Meerschweinchen wurden während 10 Tagen 150 mg Vanillin täglich appliziert (total 1,5 g). Letzteres suspendierten wir in einer 1%igen „Tween 20“-Lösung. Das Tier erhielt das im allgemeinen Teil beschriebene Spezialfutter. Versuchsdauer: Hauptperiode 11 Tage, Nachperiode 11 Tage. Gewicht des Versuchstieres am Ende des Versuches 450 g. Aus dem Harn der Hauptperiode (658 ccm) konnten nur wenige mg Benzoesäure isoliert werden. Der Rückstand der Wasserdampfdestillation lieferte 200 mg reine Vanillinsäure (Extraktion mit Äther und Umkristallisation aus Wasser mit Tierkohle). Schmelzpunkt: 207–208°. Mischschmelzpunkt: 207–208°. Auch aus dem Harn der Nachperiode (688 ccm) konnten wir nur sehr wenig Benzoesäure isolieren (15 mg roh).

F. VERSUCHE MIT ACETAT-1-C¹⁴

Orale Verabreichung an Ratte (Versuch No. 28)

Einer 405 g schweren, männlichen Albinoratte wurden 0,284 mC (6,25.10⁸ c/min. = 8,86 mg NaOAc) radioaktives Acetat in 8 Tagesportionen mit der Schlundsonde verabreicht.

Versuchsdauer: 9 Tage.

Harnmenge: 291 ccm.

Gewicht des Tieres nach Beendigung des Versuches 395 g. Aus dem Harn isolierten wir 114 mg Benzoesäure, die in üblicher Weise gereinigt wurde. Sie erwies sich als inaktiv.

Intraperitoneale Verabreichung an Meerschweinchen (Versuch No. 29)

Ein männliches Meerschweinchen, 380 g schwer, erhielt während 8 Tagen alle 24 Stunden eine Injektion von signiertem Acetat, ins-

gesamt $560 \cdot 10^6$ c/min. Die Gesamtaktivität des Harnes betrug 22,7. 10^6 c/min. oder 4,06 % der applizierten Menge. Aus dem Harn wurden 25 mg Benzoesäure von der spezifischen Aktivität 640,6 c/min. mg isoliert, das sind 0,0027 % der injizierten Menge.

Subcutane Injektion an Meerschweinchen (Versuch No. 30)

Ein 310 g schweres, männliches Meerschweinchen erhielt täglich eine subcutane Injektion von radioaktivem Acetat. Insgesamt wurden $816,2 \cdot 10^6$ c/min. injiziert. Der Versuch dauerte 8 Tage (Futter: Rüben, Salat). Aus dem Harn isolierten wir auf üblichem Wege 116 mg Benzoesäure. Wir reinigten das Produkt durch Behandlung mit Tierkohle, Umkristallisation aus Wasser unter Zusatz einiger Tropfen Eisessig und Sublimation.

1. Reinigung: 74 mg Smp. 122–123°

Spez. Aktivität bezogen auf Benzoesäure 44,9 c/min. mg

2. Reinigung: 43 mg Smp. 122–123°

Spez. Aktivität bezogen auf Benzoesäure 45,5 c/min. mg

Perorale Verabreichung an Meerschweinchen mit D-haltigem Körperwasser (Versuch No. 31)

Ein männliches Meerschweinchen erhielt nach D_2O -Injektionen $0,255$ mC Na-Acetat-1- C^{14} in 12 Dosen im Verlaufe von 27 Tagen. Es wurde dann wie üblich getötet und aufgearbeitet (Gewicht 379 g). Die Leber wurde separat untersucht (21,5 g). Aus der Harnmenge von 305 ccm isolierten wir total 3,31 g Benzoesäure. Die hohe Benzoesäureausscheidung ist durch reichliche Heufütterung erklärbar. Das Gewicht des Meerschweinchens nahm von 340 auf 380 g zu. Das Körperwasser hatte einen D-Gehalt von 2,25 At. %. Die Harnbenzoesäure enthielt 0,67 At. % D, war aber nicht radioaktiv.

Subcutane Verabreichung von Benzolcarbonsäure-C¹⁴
an Ratte (Versuch No. 32)

Einer 255 g schweren Albinoratte wurden 50 mg radioaktive Benzoessäure subcutan injiziert und während 24 Std. der Harn quantitativ aufgefangen. Die Ausatemungskohlensäure wurde während der ersten 5 Stunden in Fraktionen von je 1 Stunde zur Absorption gebracht, dann bis zum Versuchsende nur noch in Abständen von ca. 5 Stunden während je 30 Min.

Nach 24 Std. wurde das Tier getötet und Leber und Niere herauspräpariert. Gesamtgewicht 235,5 g, Leber 8,2 g, Niere 1,5 g.

Aktivität der Expirationskohlensäure:

Die spezifische Aktivität des ausgeatmeten CO₂ war sehr gering und konnte nicht exakt gemessen werden. Die in der Tabelle angegebenen Werte stellen daher nur eine Approximation dar.

Tabelle 16

Frakt.	Dauer Std.	Aktivität c/min. mg	BaCO ₃ / Std., g	Totale Aktivität/ Std., c
1	1	2,25	1,209	2720
2	1	1,88	1,796	3380
3	1	1,19 ± 0,29 (24%)	1,961	2340
4	1	0,83 ± 0,14 (17%)	1,670	1390
5	1	1,13 ± 0,22 (20%)	2,108	2380
6	1	1,02 ± 0,39 (38%)	2,113	2150
7	0,5	1,06 ± 0,39 (37%)	1,280	1360
8	0,5	1,19 ± 0,28 (24%)	1,284	1530
9	0,5	0,43 ± 0,22 (51%)	1,123	480
10	2	0,23 ± 0,23 (100%)	1,249	290

Durch graphische Auswertung wurde die totale mit der ausgeatmeten CO₂ eliminierte Aktivität auf ca. 30000 Stösse geschätzt. Während der 24 Stunden des Versuches wurden also rund 0,04% der applizierten Aktivität veratmet.

Harn: Zwei Harnproben wurden alkalisch eingedampft und direkt verbrannt. Die aus diesen Proben berechnete Aktivität des Harnes ist in der Bilanz als „totale Harnaktivität“ angeführt. Darauf wurde der Harn 8 Std. mit Äther extrahiert, der Extrakt zweimal mit einer

bekannten Menge inaktiver Benzoesäure (ca. 50 mg) versetzt und die Benzoesäure durch Sublimation wiedergewonnen. Da der nicht sublimierbare Rückstand noch radioaktiv war, verseiften wir ihn nach Zugabe einer kleinen Menge inaktiver Hippursäure mit 3n NaOH und isolierten die Benzoesäure wieder durch Ätherextraktion der angesäuerten Lösung und Sublimation des Extraktes. Wir haben folgende Aktivitäten zurückgewonnen:

a) 2 Elutionen vor der Verseifung:

Benzoesäure: $111,44 \text{ mg} = 13,9 \cdot 10^5 \text{ c/min.} = 1,89\% \text{ d. Appl.}$

b) Nach Verseifung isoliert:

Benzoesäure: $119,55 \text{ mg} = 597,9 \cdot 10^5 \text{ c/min.} = 81,4\% \text{ d. Appl.}$

Total 83,3% der appl. Menge

Tierkörper: Leber, Niere und Carcass wurden alkalisch verseift und nach Ansäuern durch Aetherextraktion die ätherlöslichen Säuren gewonnen. Die Extrakte wurden im Stickstoffstrom auf Gewichtskonstanz gebracht.

Mengen: Niere 0,1931 g

Leber 0,4084 g.

Die Nieren- und Carcassextrakte ergaben bei direkter Verbrennung sehr schwache Aktivitäten, sie wurden darum wieder vereinigt und mit inaktiver Benzoesäure ausgewaschen (inaktive Benzoesäure: 0,8537 g).

Bilanz:

Verteilung:

Totale Harnaktivität: $50 \text{ ccm} \text{ à } 1,33 \cdot 10^6 \text{ c/min. ccm} = 665 \cdot 10^5 \text{ c/min.} = 90,7\%$

Leberfettsäuren: $408,4 \text{ mg} \text{ à } 31,5 \text{ c/min. mg} = 0,13 \cdot 10^5 \text{ c/min.} = \text{ca. } 0,02\%$

Karkass total, Benzoesäureauswaschung: $0,85367 \text{ g} \text{ à } 626 \text{ c/min. mg} = 5,34 \cdot 10^5 \text{ c/min.} = 0,7\%$

Gesamte zurückgemessene Aktivität: 91,4% der Applikation.

Orale Verabreichung von Benzolcarbonsäure-C¹⁴ an Ratte (Versuch Nr. 33)

Einer 275 g schweren, männlichen Albinoratte wurden 51,42 mg radioaktive Benzoesäure, gelöst in 0,9 ccm 0,53 n NaOH mit der

Sonde eingegeben. Die Injektionsspritze und das Gefäß wurden ein erstes Mal mit 1 ccm Wasser gespült und das Spülwasser sogleich auch verabreicht. Die ausgeatmete Kohlensäure wurde in Fraktionen zu je 1 Std. aufgefangen:

Fraktion 1: 0– 1 Std.

„ 2: 1– 2 „

„ 3: 2– 3 „

„ 4: 3– 4 „

„ 5: 8– 9 „

„ 6: 30–31 „

„ 7: 59–60 „

Nach 2 Std. wurde die Sonde und das Gefäß wieder mit 2 ccm Wasser gespült und das Spülwasser der Ratte verabreicht. Die restliche Aktivität der Werkzeuge wurde durch Auswaschen mit 45,75 mg Benzoessäure (als Na-Benzoesäurelösung) zurückgewonnen. Der Harn wurde in 3 Fraktionen zu je 24 Std. aufgefangen, im Sammelgefäß waren je 4 ccm 1 n NaOH vorgelegt. Das Käfigspülwasser wurde separat aufbewahrt und auf 250 ccm aufgefüllt. Die Tagesharne (9 ccm, 8 ccm und 2 ccm) wurden je auf 50 ccm verdünnt. Von jeder Fraktion wurden zwei Eindampfproben hergestellt (0,5 ccm für die Harne, 1 ccm für das Spülwasser) und diese direkt verbrannt (Zugabe von Trägerbenzoessäure). Nach 3 Tagen (72 Std.) wurde das Tier getötet und nach Zerkleinern gesamthaft mit 500 ccm HCl halbkonz. 6 Std. verseift. Anschliessend Extraktion im Rührextraktor mit Äther. Öliger Extrakt: 32,47 g (gewichtskonst.). Die über H_2SO_4 getrockneten Faeces wogen 1,544 g.

Total appliziert: $771,3 \cdot 10^5$ c/min.

Aufgefunden:

1. Harn

1 50 ml à $1,28 \cdot 10^6$ c/min. ml $641 \cdot 10^5$ c/min.

2 50 ml à $1,58 \cdot 10^4$ c/min. ml $7,9 \cdot 10^5$ c/min.

3 50 ml à $3,12 \cdot 10^4$ c/min. ml $15,6 \cdot 10^5$ c/min.

4 250 ml à 4660 c/min. ml $11,7 \cdot 10^5$ c/min.

Harn total 87,8% oder $676,2 \cdot 10^5$ c/min.

2. Faeces

1544 mg à 1955 c/min. mg
0,4% oder $3,02 \cdot 10^5$ c/min.

3. Carcass, ätherlösliche Säuren

32470 mg à 41 c/min. mg

1,7 % oder 13,3.10⁵ c/min.
Total 89,9 % oder 692,5.10⁵ c/min.

Tabelle 17:

Aktivität der ausgeatmeten Kohlensäure

Fraktion	Spez. Aktivität c/min. mg	mg BaCO ₃ /Std.	Tot. Akt./Std. c/min.
1	1,31 ± 0,57	2080	2720
2	1,09 ± 0,53	2200	2410
3	1,11 ± 0,01	2170	2410
4	0,91 ± 0,00	2610	2370
5	0,48 ± 0,24	2620	1260
6	0,65 ± 0,28	2270	1480
7	0,62 ± 0,41	2200	1360

Die gesamte ausgeatmete Aktivität muss unter 0,18 % der applizierten Menge liegen.

Orale Verabreichung von D- und C¹⁴-signierter Benzoessäure (Versuch No. 35)

Einem 317 g schweren, männlichen Meerschweinchen wurden 500 mg einer Benzoessäure, welche sowohl deuteriert als auch an der Carboxylgruppe mit C¹⁴ signiert war, per os verabreicht. Das Tier erhielt täglich zweimal 50 mg Säure als Na-Salz in Orangensaft gelöst. Die Applikation erfolgte mit der Kugelpipette, also nicht absolut quantitativ, was für diesen Versuch belanglos war. Versuchsdauer: 6 Tage, Normalfutter (Heu).

Aus 224 ccm Harn wurden 820 mg Benzoessäure isoliert.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird auf die Hippursäure bzw. Benzoesäure als normaler Bestandteil menschlichen und tierischen Harnes hingewiesen und die Frage der Herkunft oder Entstehung der Benzoesäure geprüft.

2. Auf Grund von Literaturhinweisen soll Phenylalanin durch Bakterien oder körpereigene Enzyme zu Benzoesäure abgebaut und damit hauptsächlich zu ihrer Entstehung beitragen. Wir stellten L-, D- und DL-Deuterio-Phenylalanin dar und verabreichten es an gesunde Versuchspersonen, Kaninchen und Meerschweinchen. Aus dem Harn liessen sich stets Benzoesäure-Fractionen mit geringen D-Gehalten isolieren. Es ist damit bewiesen, dass Benzoesäure tatsächlich aus Phenylalanin gebildet wird, indessen dürften nur geringe Anteile der täglich ausgeschiedenen Hippursäuremengen aus dieser Quelle stammen. Nur bei eigentlicher Belastung mit Deuterio-Phenylalanin (Kaninchen) haben wir in der Benzoesäure hohe D-Gehalte gemessen, so dass feststehen dürfte, dass unter solchen Bedingungen Phenylalanin vermehrt zu Benzoesäure abgebaut wird.

3. Durch Dehydrierungen offenbar hydroaromatischer Verbindungen der Nahrung entsteht Benzoesäure, da nach Anreicherung der Körperflüssigkeit an D_2O beim Meerschweinchen und Ratten stets D-haltige Benzoesäure ausgeschieden wird. Dasselbe ist der Fall nach Fütterung von Hexahydrobenzoesäure an solche Tiere.

4. Heu und wässrige Extrakte desselben führen bei Kaninchen und Meerschweinchen zu ausgeprägter Vermehrung der Benzoesäure im Harn. Der Benzoesäurebildner ist aber aus dem Heu nur teilweise mit Wasser extrahierbar.

5. Chinasäure wird in Bestätigung der Befunde von Dickens (27) von Menschen zu Benzoesäure aromatisiert. Es konnte gezeigt werden, dass auch Meerschweinchen dazu befähigt sind.

6. Entgegen den Angaben von Fischer und Bielig (32) gelang es uns nicht, durch Geraniolfütterung die Benzoessäureausscheidung beim Kaninchen zu steigern.

7. Vanillingaben führen bei Meerschweinchen gleichfalls nicht zu erhöhter Benzoessäureausscheidung.

8. Eine Synthese von Benzoessäure aus kleinen Einheiten etwa aus dem C₂-Bruchstück, liess sich nicht nachweisen. Nach Gaben von ¹⁴C-Acetat an Meerschweinchen oder Ratten wies die Benzoessäure keine messbaren Aktivitäten auf.

9. Benzoessäure stellt ein Stoffwechselendprodukt dar, das nicht mehr abgebaut werden kann. Nach Fütterung von Carboxyl-¹⁴C-Benzolcarbonsäure oder Deuterio-Benzoessäure wurden solche signierte Verbindungen unter Berücksichtigung der körpereigenen Benzoessäure mit praktisch unveränderten D-Gehalten bzw. Aktivitäten aufgefunden. Die Expirationskohlendensäure weist auch bei langfristigen Versuchen keine nennenswerte Aktivität auf.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Bunge G. von, und Schmiedeberg O., Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol. 6 233 (1876).
2. Borsook H. und Dubnoff J. W., J. biol. Chem. 168 397 (1947), 132 307 (1940).
3. Chantrenne H., J. biol. Chem. 189 227 (1951).
4. Thomas P., Manuel de Biochimie, Masson, Paris 1946, p. 844.
5. Rudolf W., Biochemie des Aminosäurestoffwechsels, Hans Huber, Bern, p. 68.
6. Womack M. und Rose W.C., J. biol. Chem. 107 449 (1934).
7. Moss A. R. und Schoenheimer R., J. biol. Chem. 135 415 (1940).
8. Kotake Y., Masai Y. und Mori Y., Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 122 195 (1922).
9. Shambough N.F., Lewis H. B. und Tourtelotte D., J. biol. Chem. 92 499 (1931).
10. Penrose L., Lancet 1 23 (1935).
11. Fölling A., Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 227 169 (1934).
12. Jervis G. A., J. biol. Chem. 126 305 (1938).
13. Jaffé M., Z. f. physiol. Chem. 62 58 (1909).
14. Bernhard K. und Gressly E., Helv. 24 83 (1941).
15. Weinhouse S. und Millington R. H., J. biol. Chem. 175 995 (1948).
16. Shepartz B. und Gurin S., J. biol. Chem. 180 663 (1949).
17. Winnick T., Friedberg F. und Greenberg D. M., J. biol. Chem. 173 189 (1948).
18. Salkowski E. und Salkowski H., Ber. dtsch. chem. Ges. 12 648 u. 653 (1879).
19. Baumann E., Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem. 10 131 (1886).
20. Moss A.R. und Schoenheimer R., J. biol. Chem. 135 415 (1940).
21. Rittenberg D., Keston A. S., Schoenheimer R. und Foster G. L., J. biol. Chem. 125 1 (1938).
22. Dickens F. und Pearson J., Biochem. J. 48 216 (1951).
23. Fischer E. und Schoeller W., Liebigs Ann. 357 1 (1907).
24. Turner E. E., J. chem. Soc. 1951 842.
25. Du Vigneaud V. und Meyer C. E., J. biol. Chem. 98 302 (1932).
26. Dauben W. G., Reid J. C. und Yankwich P. E., Anal. Chem. 19 828 (1947).
27. Beer C. T., Dickens F. und Pearson J., Biochem. J. 48, 222 (1951),
Quick A. J., J. biol. Chem. 92 65 (1931).

- 28a. Bernhard K. und Caffisch-Weill H., *Helv.* 28 1697 (1945).
- b. Bernhard K., *Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem.* 248 256 (1937).
- c. Bernhard K., *Schweiz. Med. Woch.* 68 962 (1938).
- d. Bernhard K., *Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem.* 256 49 (1938).
- 29a. Dickens F., *Brit. med. Bull* 4 348 (1947).
- b. Dickens F., *Nature* 159 839 (1947).
- c. Baltes B. J., Elliot W. H., Doisy E. A. jun. und Doisy E. A., *J. biol. Chem.* 194 627 (1952).
- 30. Loew O., *J. für prakt. Chem. (neue Folge)* 19 309 (1879).
- 31. Lautemann E., *Liebigs Ann.* 125 9 (1863).
- 32. Fischer F.G. und Bielig H. J., *Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem.* 266 73 (1940).
- 33. Grundmann C. und Loew I., *Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem.* 256 141 (1938).

CURRICULUM VITAE

Am 31. Mai 1926 wurde ich, Jean-Paul Vuilleumier, als Sohn des Roland, Bankbeamter, und der Berthe Vuilleumier-Robert in Basel geboren. Hier besuchte ich die Primarschule, das Realgymnasium und bestand im Frühjahr 1945 die Maturitätsprüfung.

Anschliessend wendete ich mich an der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel dem Chemiestudium zu und wählte Botanik, physikalische Chemie und Physik als Nebenfächer.

Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen und Praktika folgender Dozenten:

K. Bernhard, M. Brenner, P. Buchner, H. Erlenmeyer, M. Geiger-Huber, C. Grob, P. Huber, K. Jaspers, H. Kuhn, W. Kuhn, E. Miescher, H. Mohler, T. Reichstein, E. Schlittler, O. Schuepp, G. Senn, E. Sorkin, W. Vischer und R. Wizinger.

Meine Dissertation entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Bernhard am physiologisch-chemischen Institut der Universität Basel.

